


***Электронно–
микроскопические методы
исследования
микроорганизмов***

СПбГУ
2015г.



Основополагающие области знаний,
позволившие сконструировать электронный
микроскоп:

- Теория электромагнитного поля
- Волновая оптика
- Открытие электрона

Разрешающая способность микроскопа:

В световом 0,5 -1 мкм

В электронном 20нм

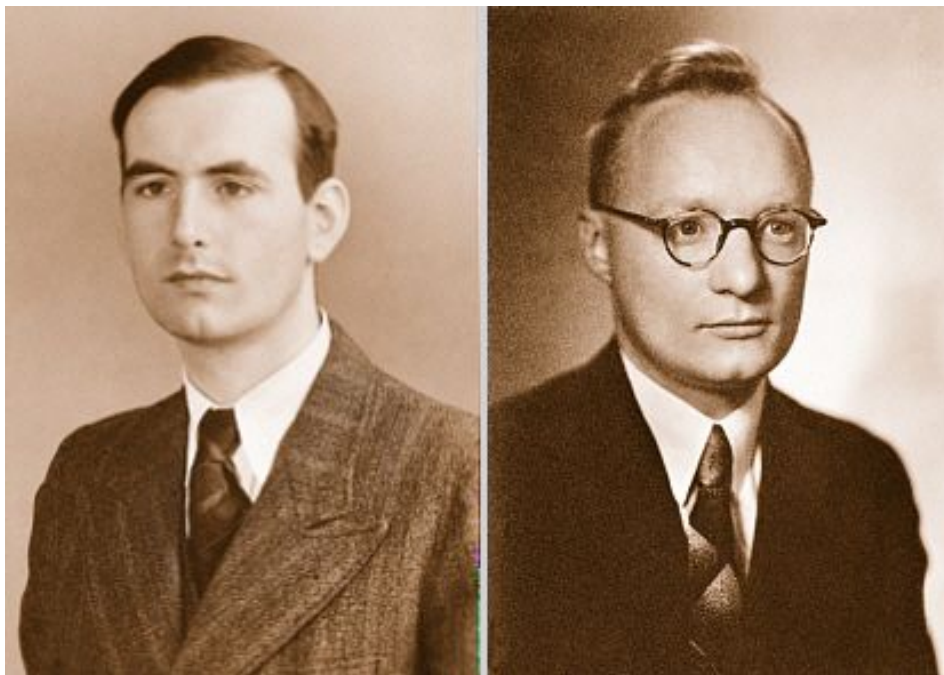
В атомном электронном 0,3 нм

$$1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$$

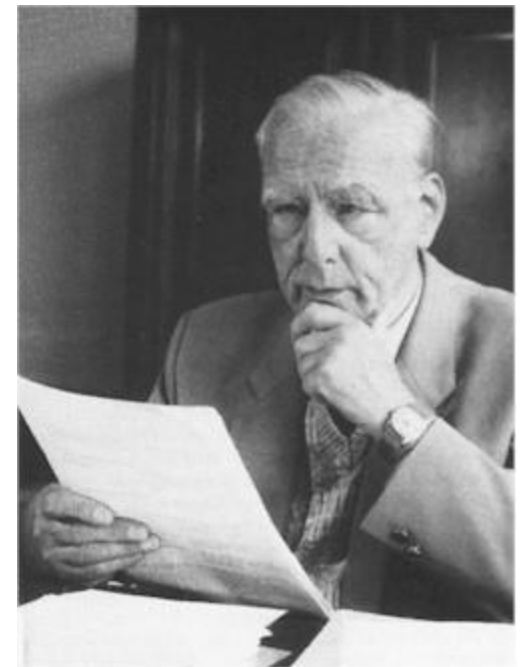
Размеры молекул некоторых веществ в нанометрах


Вещество	Диаметр молекулы, нм
■ Азот	■ 0,32
■ Вода	■ 0,30
■ Водород	■ 0,25
■ Гелий	■ 0,20
■ Кислород	■ 0,30
■ Оксид серы (IV)	■ 0,34
■ Оксид углерода (IV)	■ 0,33
■ Оксид углерода (II)	■ 0,32
■ Хлор	■ 0,37
■ Хлороводород	■ 0,30

**Ernst Ruska (Эрнст Руска) получил
Нобелевскую премию:
За фундаментальные работы в электронной
оптике и за разработку первого
электронного микроскопа(1932г.) 1986г.**



Ernst Ruska (1906 – 1988) and Bodo von Borries (1905 – 1956)





**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ,
совокупность электронно-зондовых
методов исследования
микроструктуры тел и их состава с
помощью электронных микроскопов
(ЭМ) - приборов, в которых для
получения увеличенных
изображений используют
электронный пучок.**

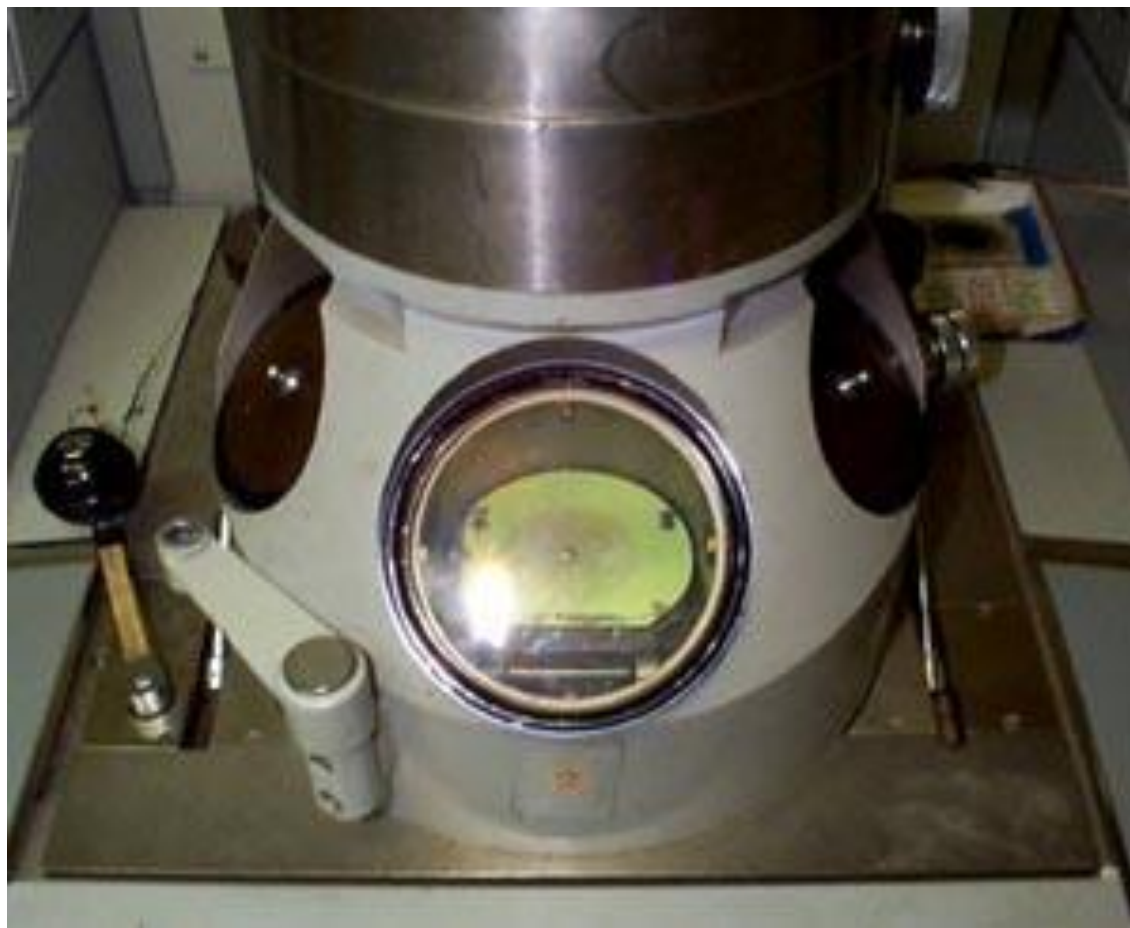
ВИДЫ ЭЛЕКТРОННЫХ МИКРОСКОПОВ:

- ПРОСВЕЧИВАЮЩИЙ
(ТРАНСМИССИОННЫЙ)
ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП (1932г)
(Эрнст Руска)
- СКАНИРУЮЩИЙ (РАСТРОВЫЙ)
ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП (1952г)
(Чарльз Отли)

Общий вид электронного микроскопа

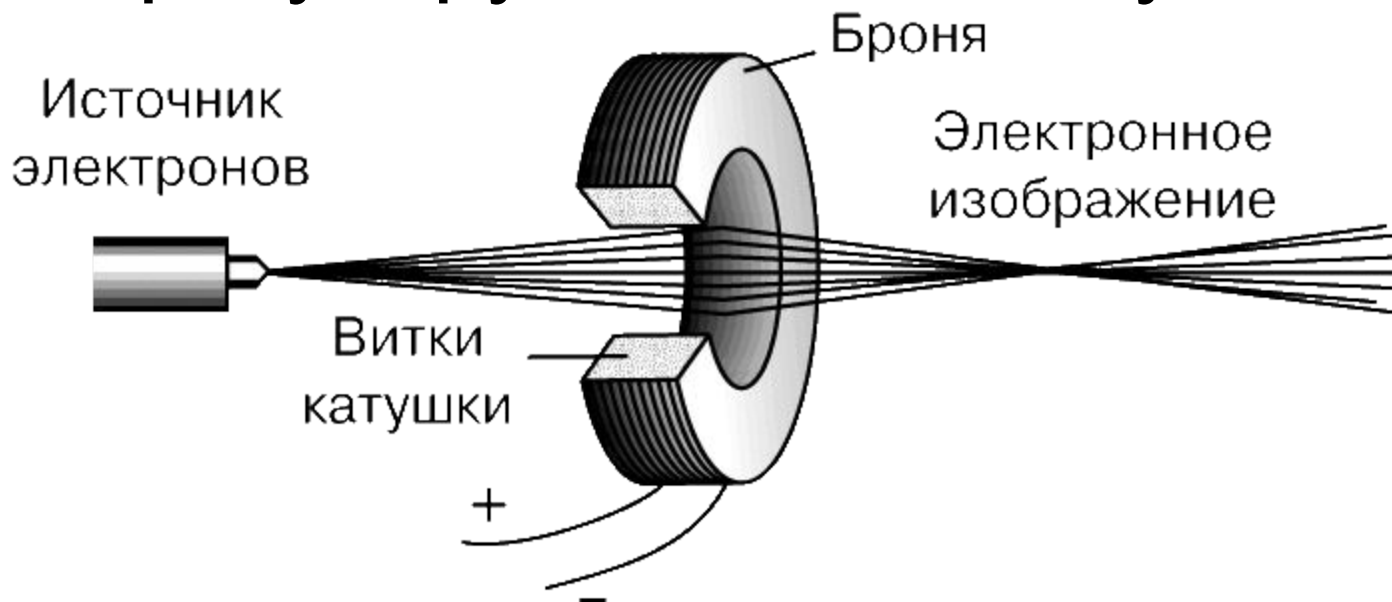


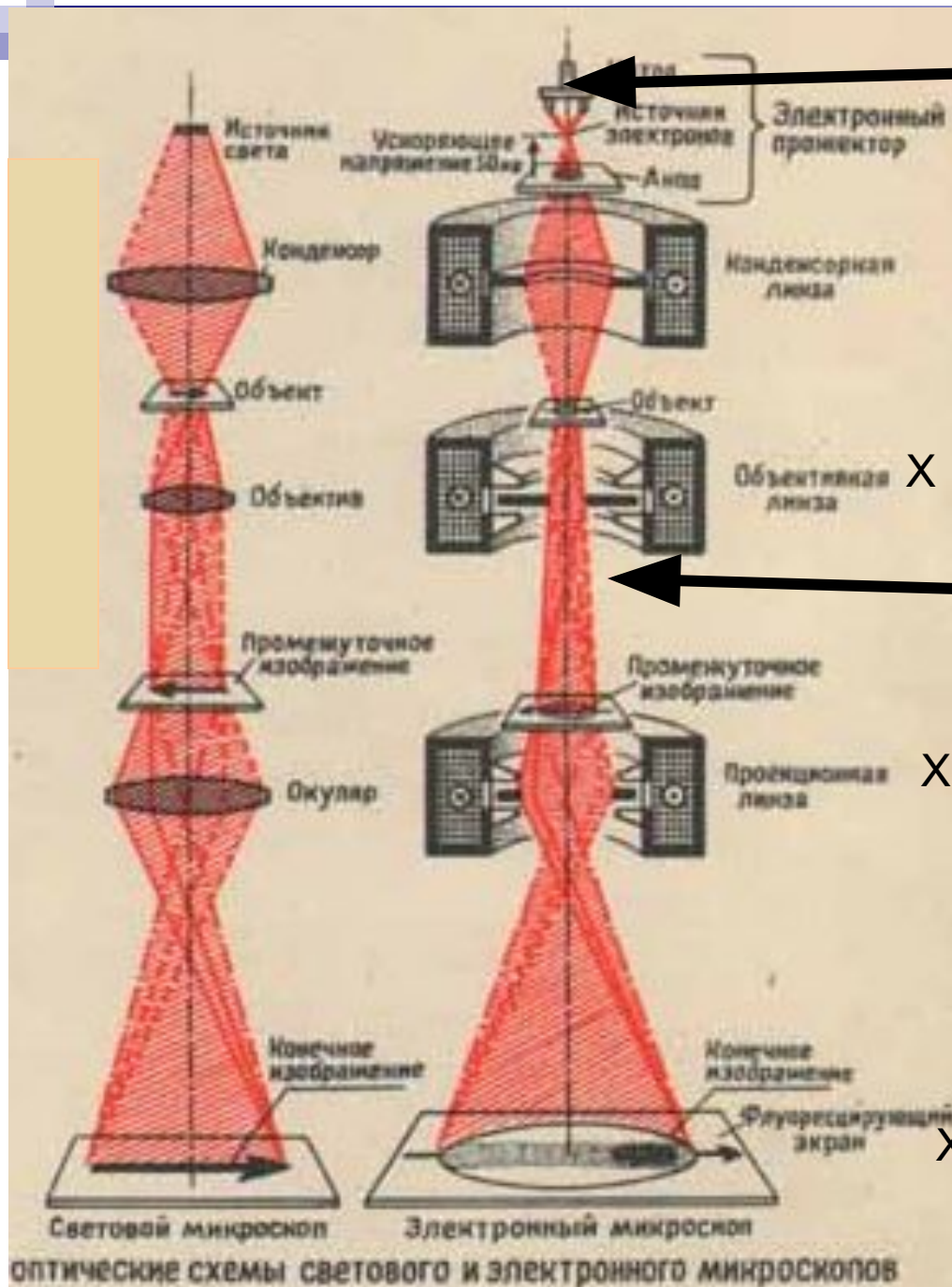
Смотровое окно



Электронная оптика - МАГНИТНАЯ ЛИНЗА+ЭЛЕКТРОННАЯ ПУШКА.

Витки провода, по которым проходит ток, фокусируют пучок электронов так же, как стеклянная линза фокусирует световой пучок.





Потенциал 100 000В
на вольфрамовый катод

Магнитное поле в
10-100тыс раз больше
Магнитного поля Земли

X 100

Давление $1/10^9$
атмосферного

X 10-1000

X 1000 - 1000 000

оптические схемы светового и электронного микроскопов

Методы приготовления объектов для просвечивающей электронной микроскопии:

- Метод ультратонких срезов (эу- и прокариоты, вирусы, бактериофаги).
- Метод контрастирования или окрашивания (позитивное или негативное) (прокариоты, фаги, вирусы; эу- нельзя из-за больших размеров).

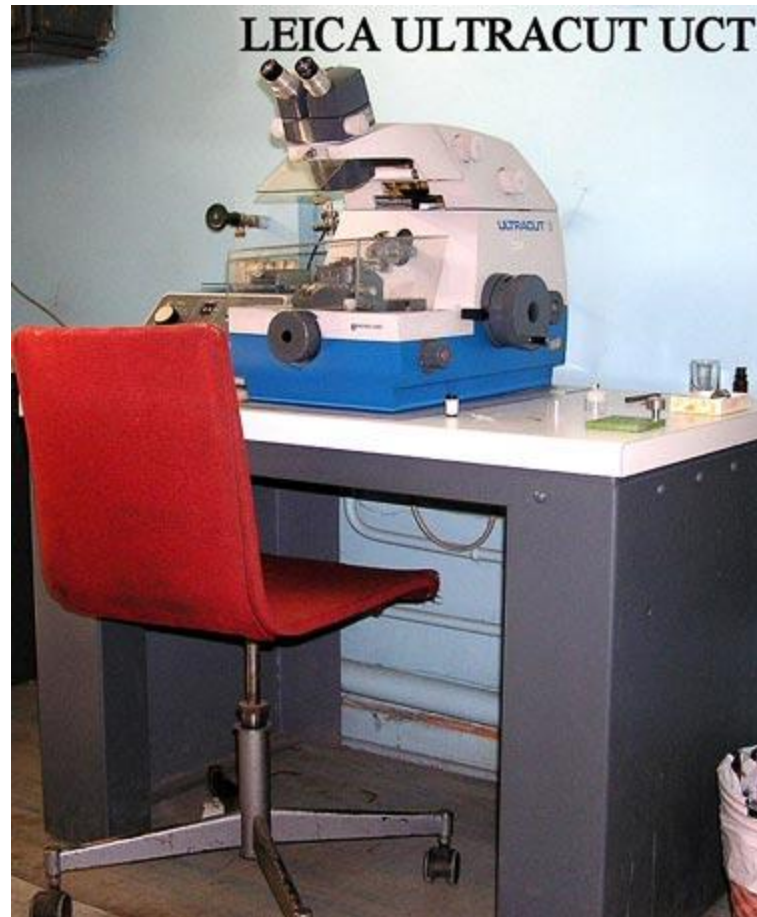
Этапы приготовления препаратов для электронной микроскопии

1. **Фиксация образца** глутаральдегидом или другими фиксирующими веществами.
2. **Обезвоживание и высушивание** сохраняя естественный микрорельеф поверхности (сушка с использованием сжиженных CO_2 и N_2O).

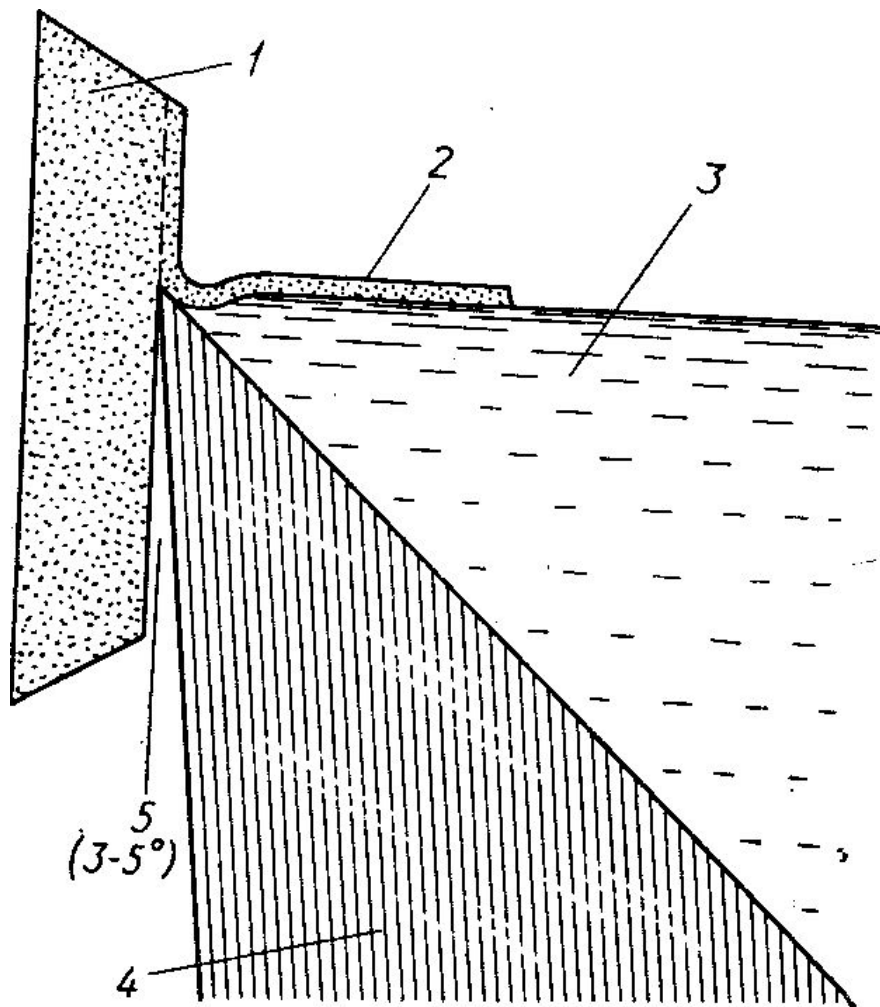
Этапы приготовления препаратов для электронной микроскопии

- 3. Образцы заливают в пластмассы или смолы и нарезают при помощи ультрамикротомы**

Ультрамикротом LEICA ULTRACUT UCT



Установка стеклянного ножа для получения срезов:



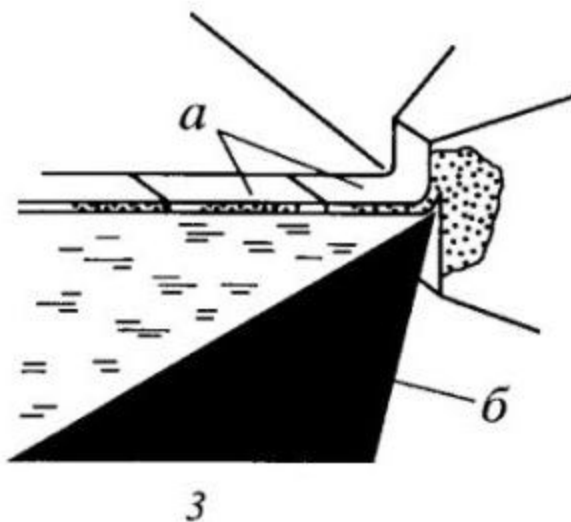
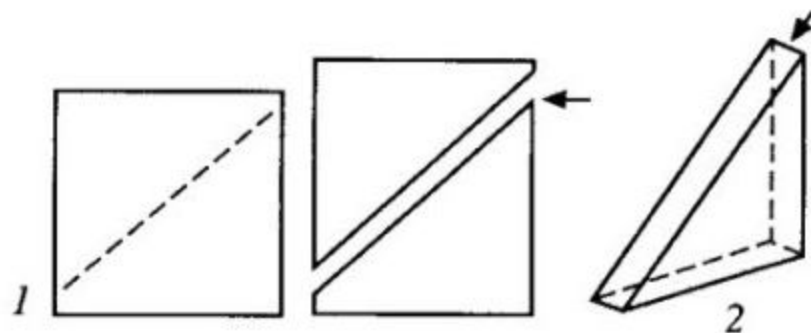
образцы толщиной 2–200 нм,
помещают на сетку с размером
ячейки около 0,05 мм

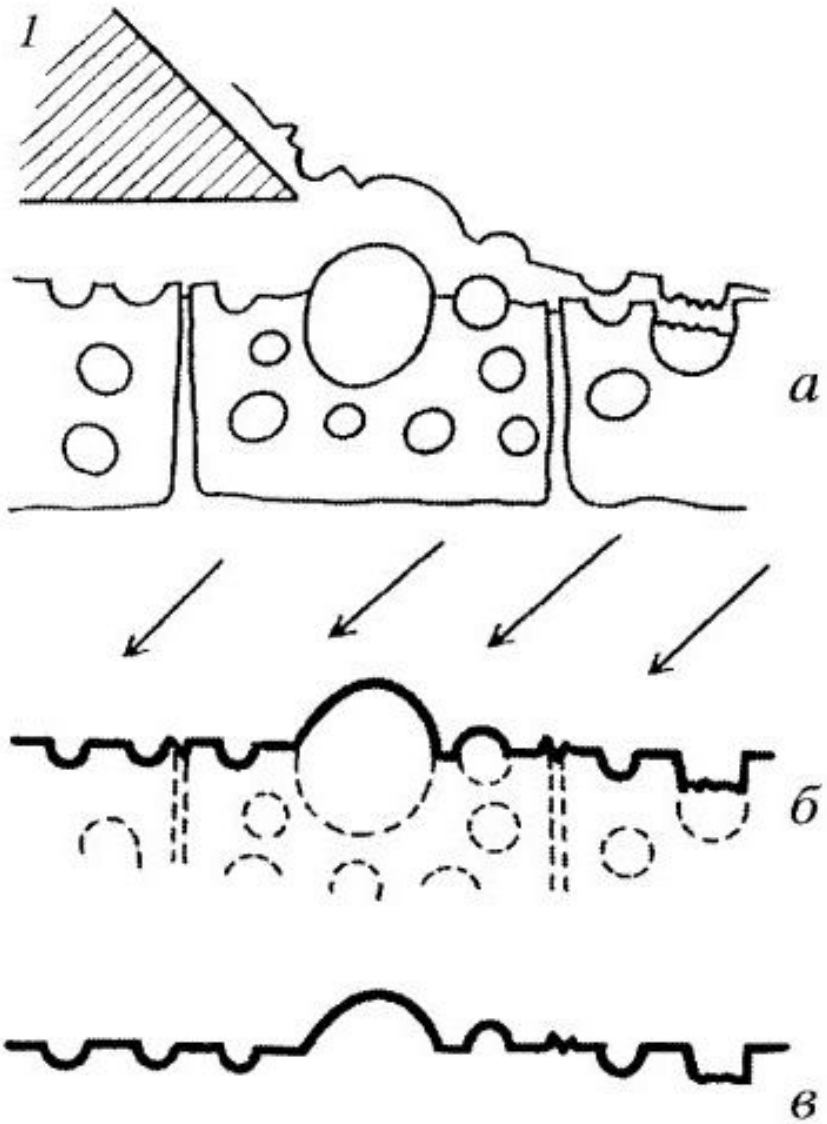
1 — блок; 2 — срез;
3 — ванночка, наполненная
жидкостью; 4 — нож;
5 — требуемый угол между ножом
и блоком.

1-стеклянный блок (заготовка для приготовления ножа)

2-стеклянный нож

3-наслаивание сеточки на ультратонкий срез





а - срез объекта

б - контрастирование объекта

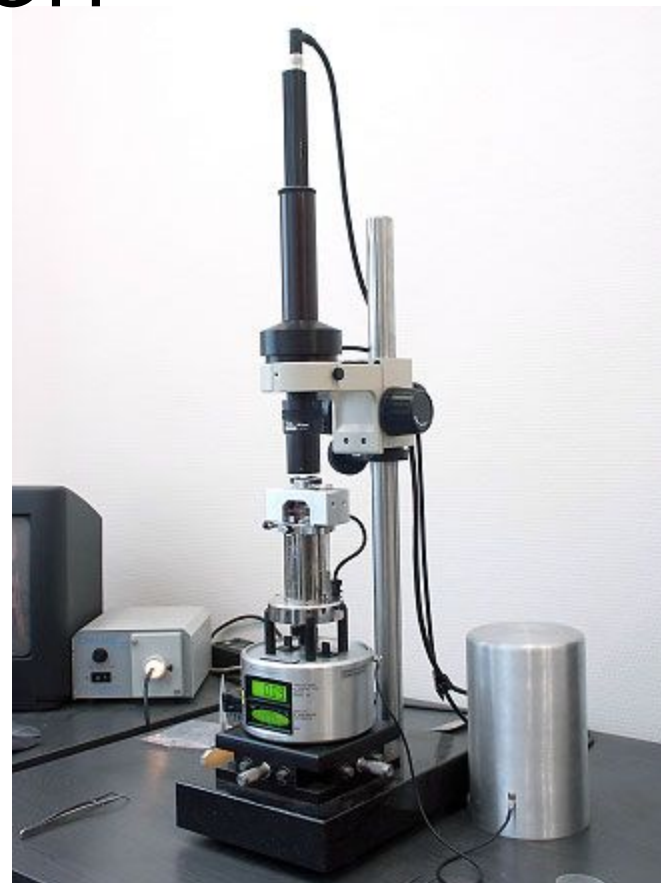
в - видимое изображение

Контрастирование (ПЭМ)

проводят соединениями тяжелых металлов (уран, в виде уранилацетата, свинец, осмий, вольфрам, молибден).

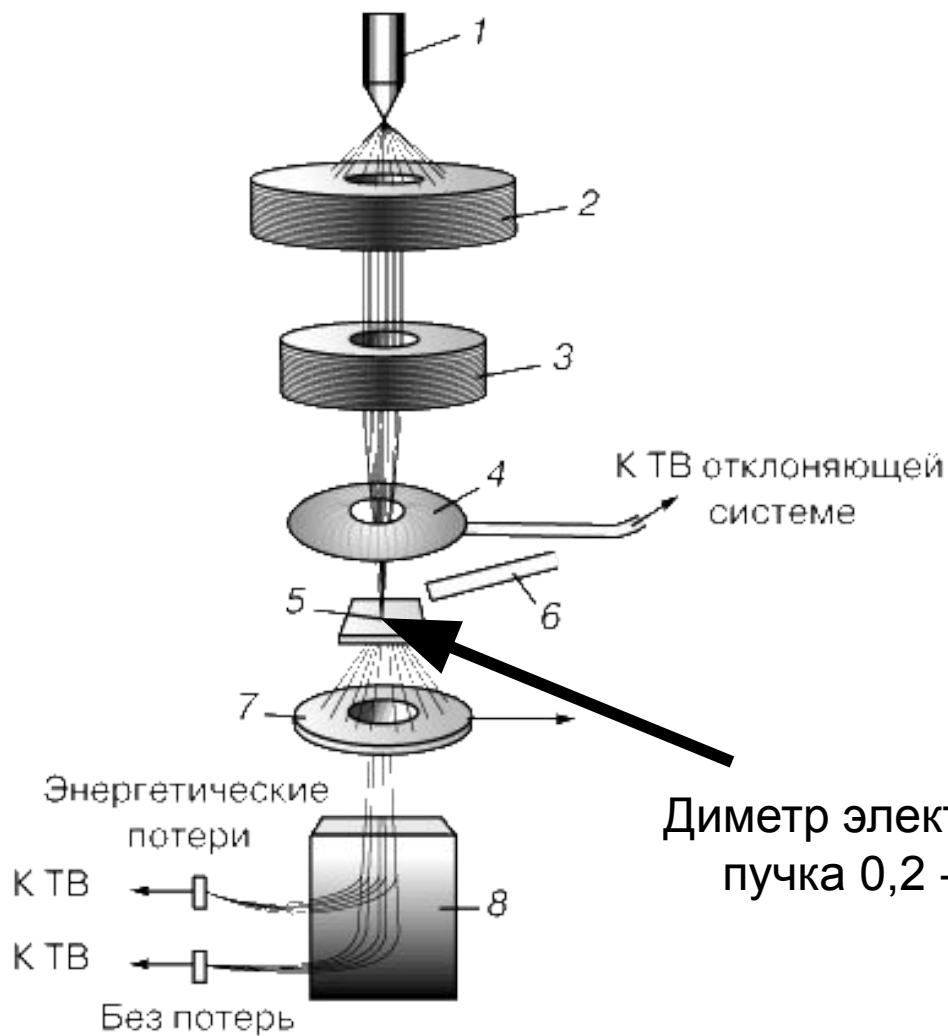
Для усиления контраста используют: свинец, осмий, золото, вольфрам, уран.

СКАНИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП



Сканирующий зондовый микроскоп
MultiMode NanoScope III (Veeco)
10 Ангстрем

СКАНИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП



- 1 – источник электронов;
- 2 – ускоряющая система;
- 3 – магнитная линза;
- 4 – отклоняющие катушки;
- 5 – образец;
- 6 – детектор отраженных электронов;
- 7 – кольцевой детектор;
- 8 – анализатор.

Диаметр электронного пучка 0,2 -10 нм

Настольная напылительная установка Scancoa Six (для сканирования)

Предельное остаточное давление 7×10^{-5} Па


Время откачки:
до 1×10^{-3} Па 13 мин
до 2×10^{-4} Па 60 мин

Слой напыления 15-20нм



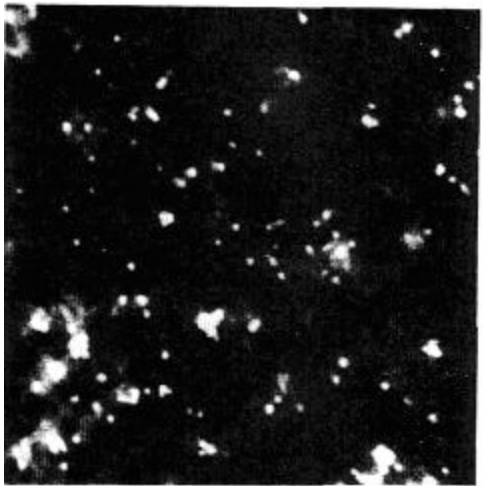
Напыление проводящего слоя (аурум, серебро, платина) на образцы для электронной микроскопии



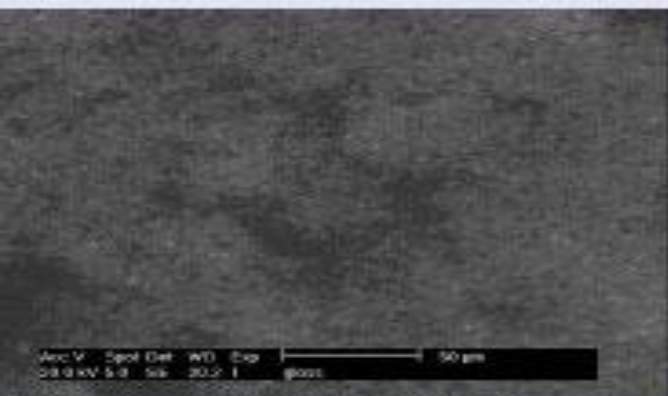


Примеры электронных
фотографий (электонограмм):

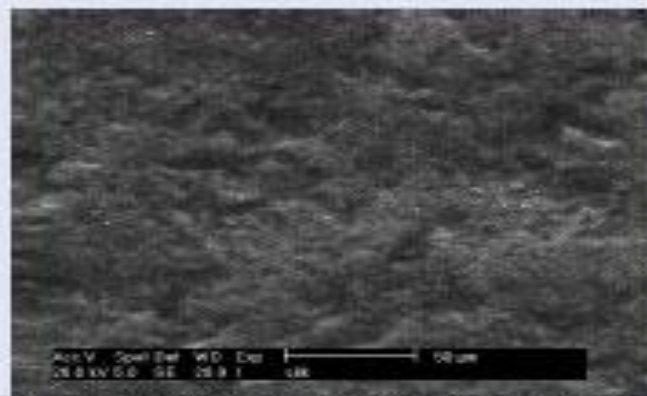
Атомная электронная микроскопия с разрешающей способностью 0,3 нм



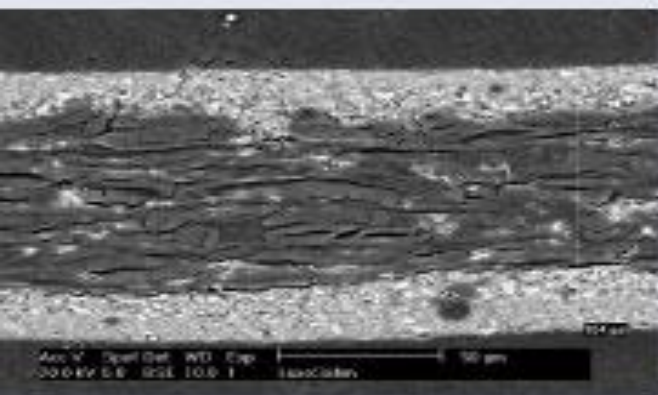
Изображение атомов урана (светлые пятна) на тонкой подложке из углерода (при увеличении в 7,5 млн. раз).



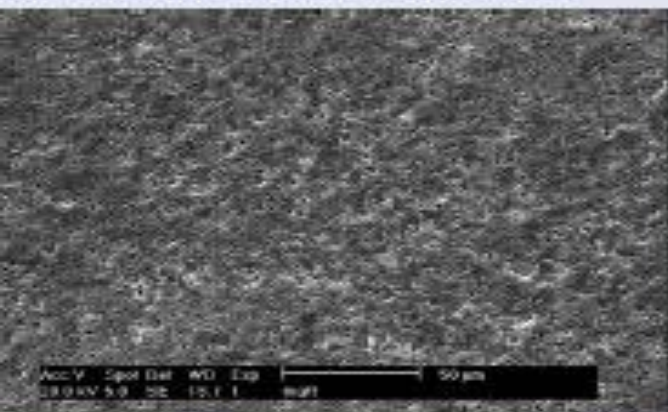
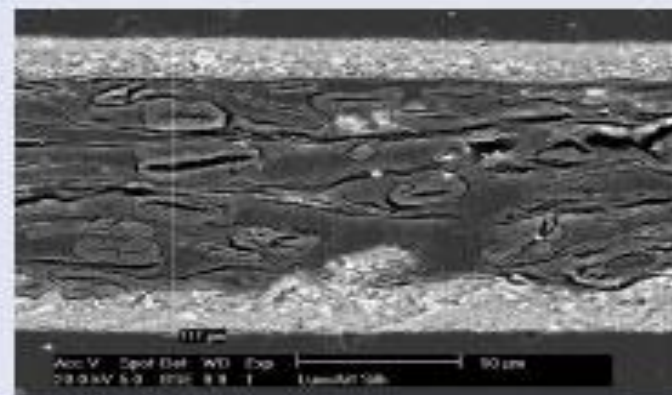
Поверхность глянцевой мелованной бумаги



Поверхность полуматовой мелованной бумаги



Поперечный срез двух видов бумаги (135 г/м²) демонстрирует разницу в толщине и плотности после каландрирования



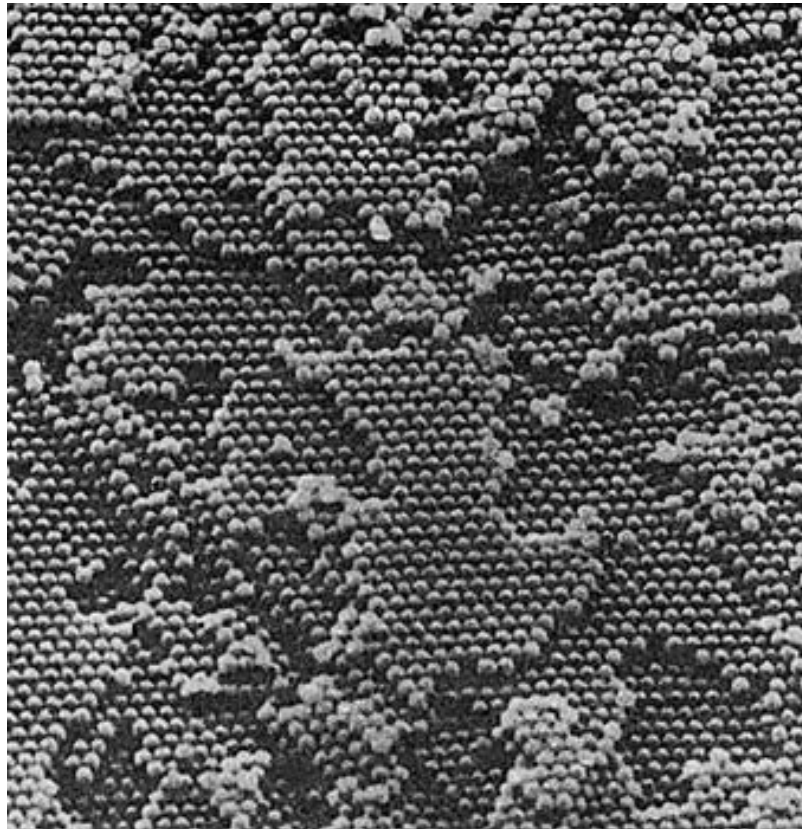
Поверхность матовой неолованной бумаги

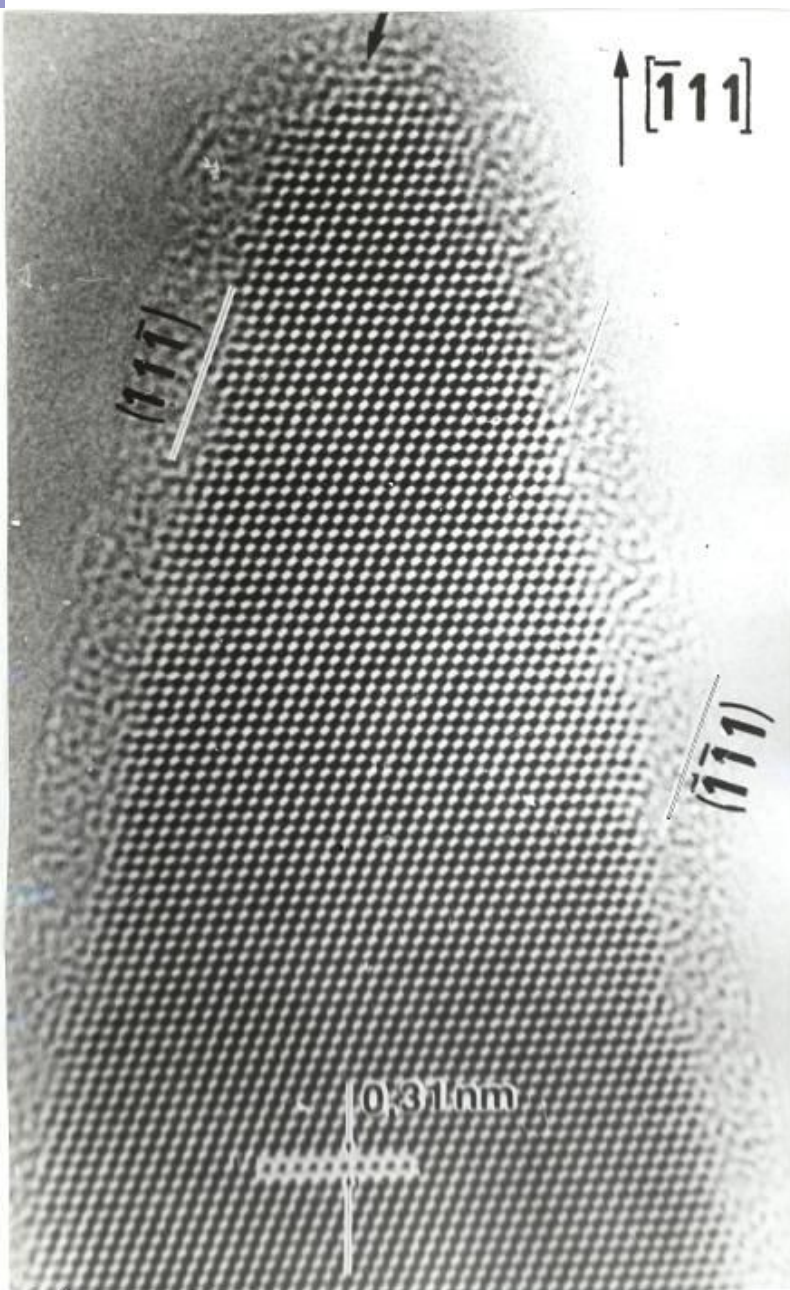


Пористая поверхность неолованной бумаги

Сканирующая электронная микроскопия. Сравнение поверхности различных типов бумаги.

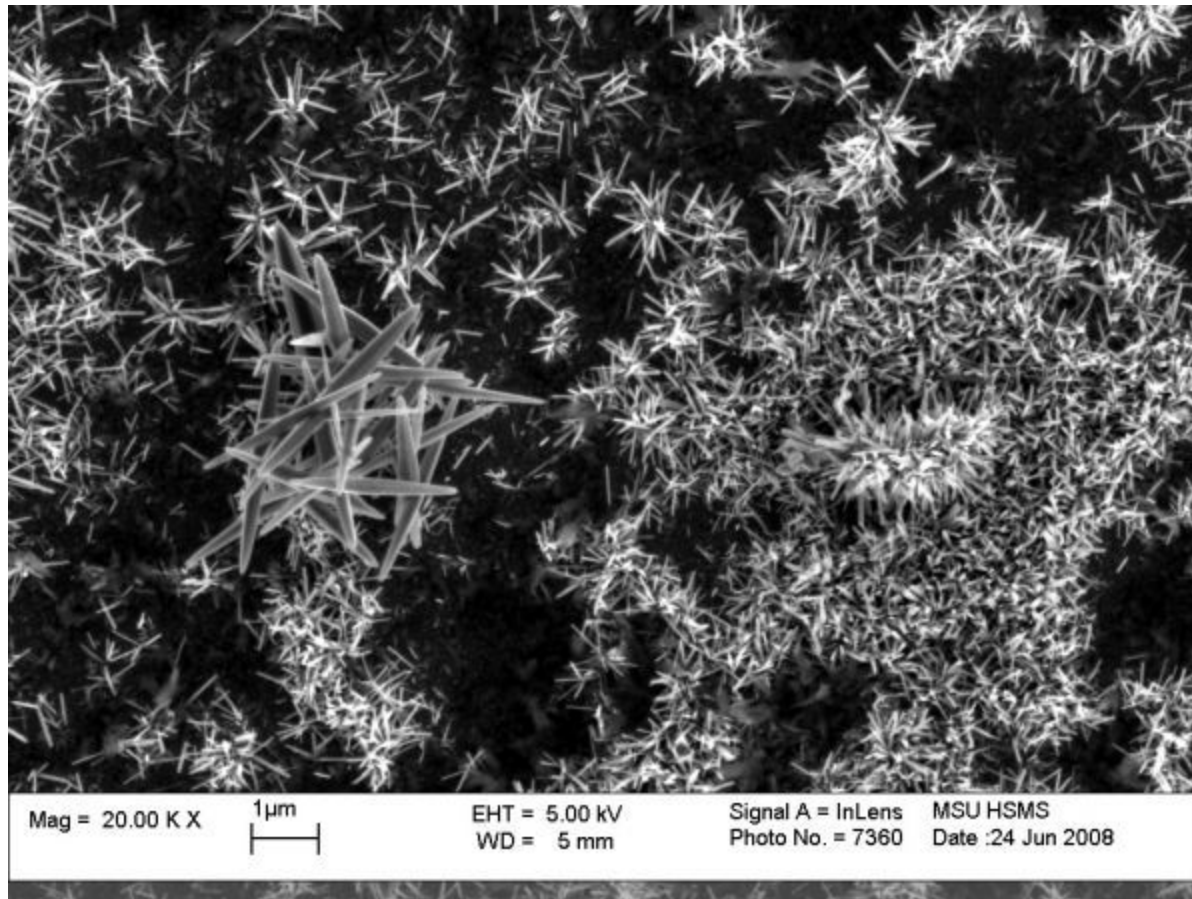
Электронно-микроскопические
особенности благородного опала -
сферы уложены в строгом
геометрическом порядке



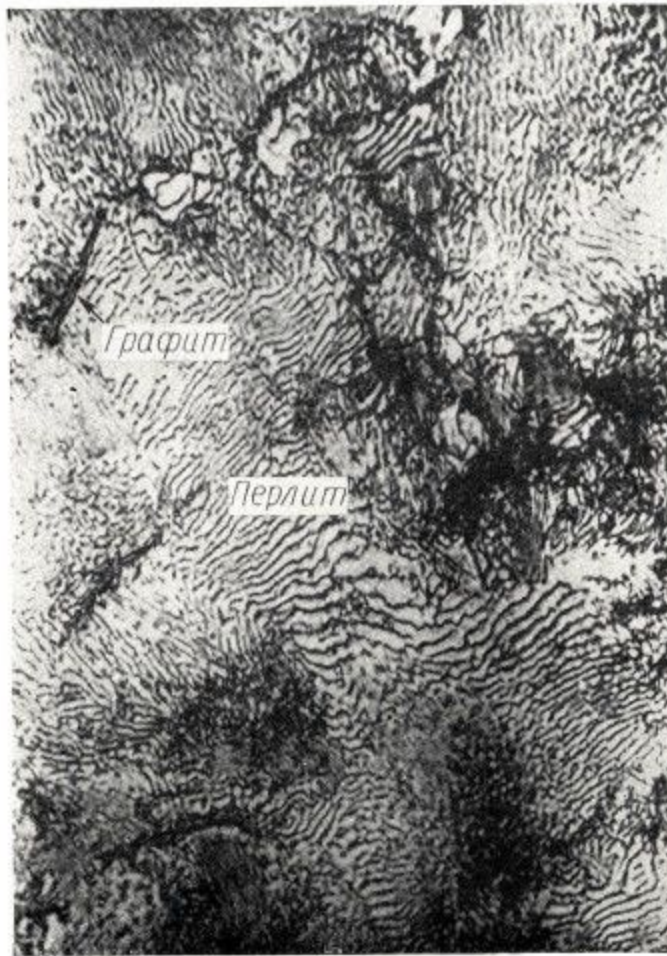


Атомарная
структура
вершины
кремниевого
острия. Каждая
точка
соответствует
атому кремния.

Оксид цинка на кремниевой подложке



МИКРОСТРУКТУРА ЧУГУНА



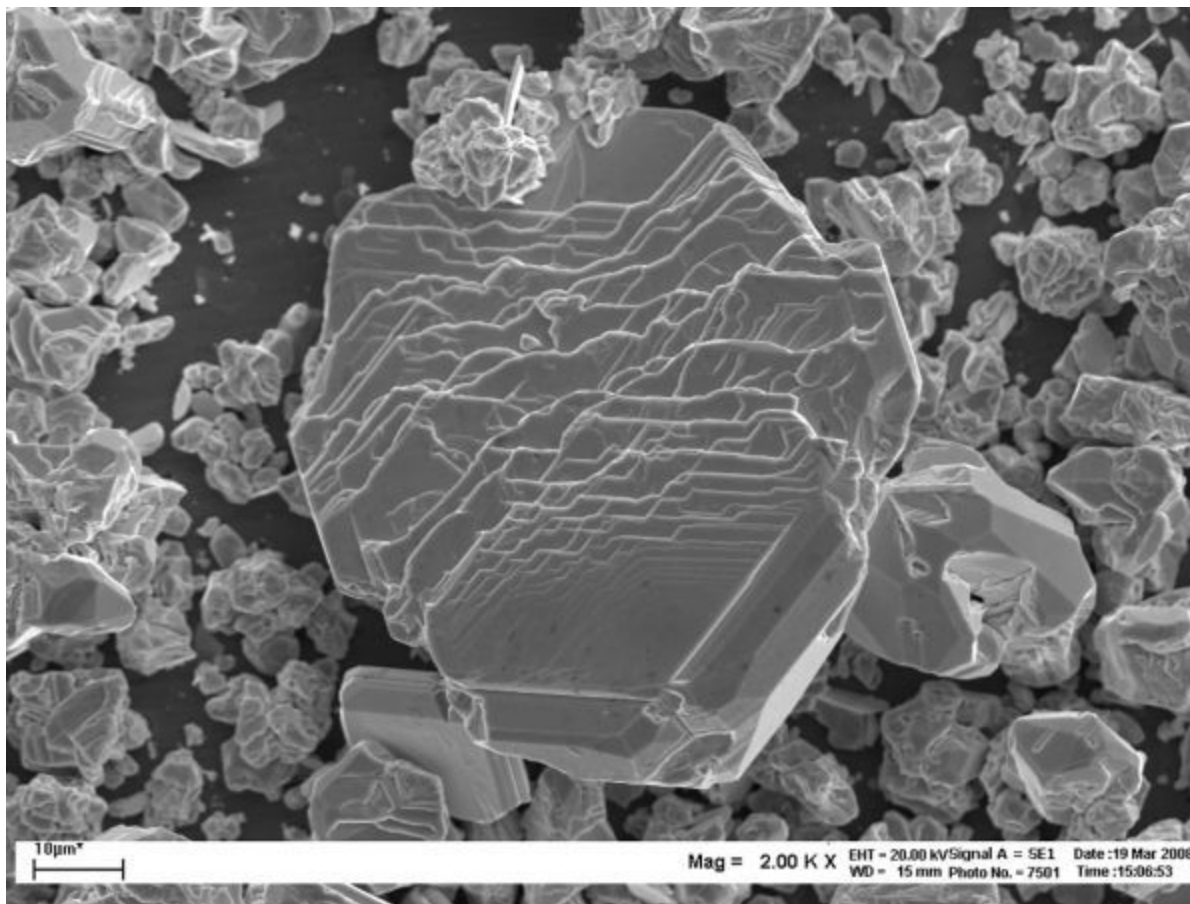
а)



б)

Фиг. 33. Серый чугун после травления:
— а — перлитно-графитная микроструктура, отвечающая высокой твердости и износостойкости, $\times 1000$; б — перлитно-ферритно-графитная микроструктура, отвечающая пониженной твердости и износостойкости, $\times 200$.

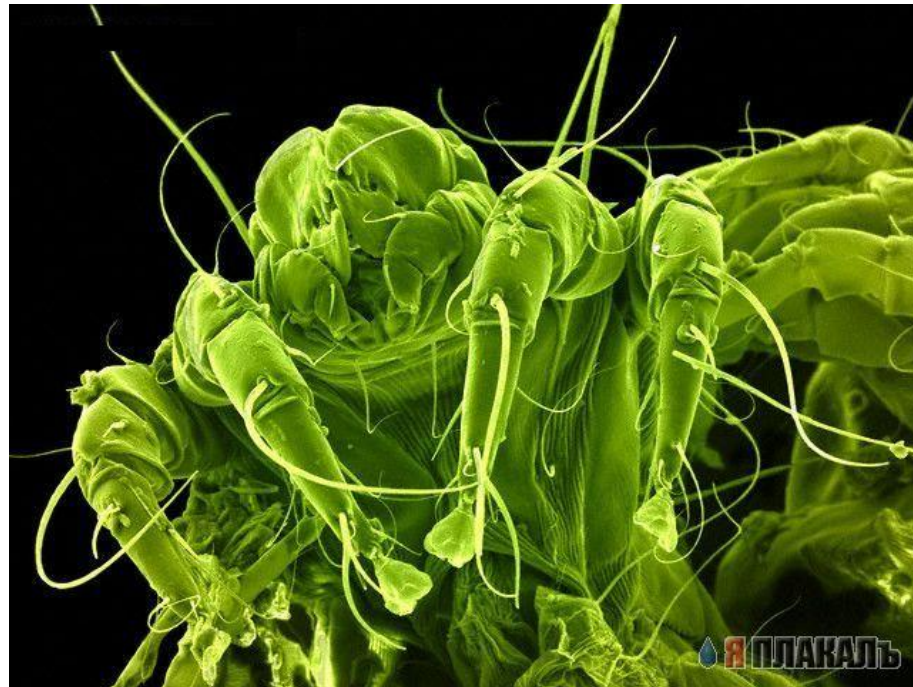
Микрокристаллы серебра



Микромир, фото выполненные при помощи сканирующего электронного микроскопа.



Фотографии пылевых клещей, сделанные с помощью сканирующего электронного микроскопа

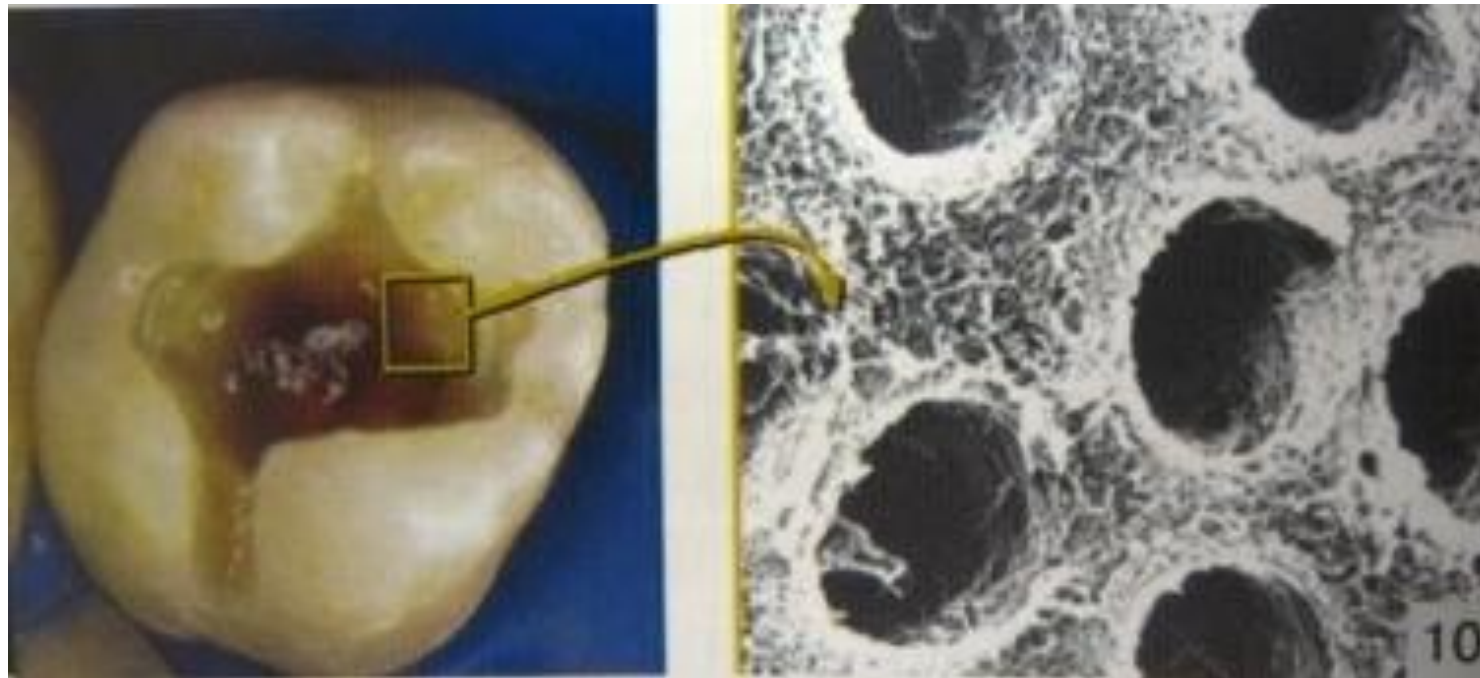


Lamblia intestinalis (вегетативная форма) под электронным микроскопом



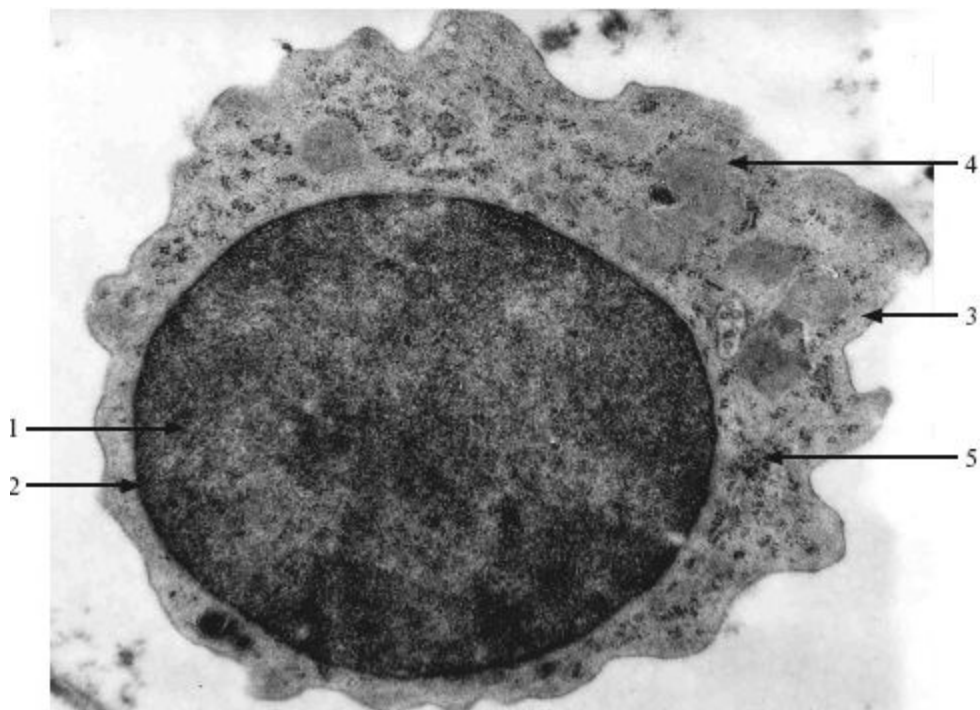
Изображение получено с применением сканирующего электронного микроскопа

Строение дентина (электронный сканирующий микроскоп)

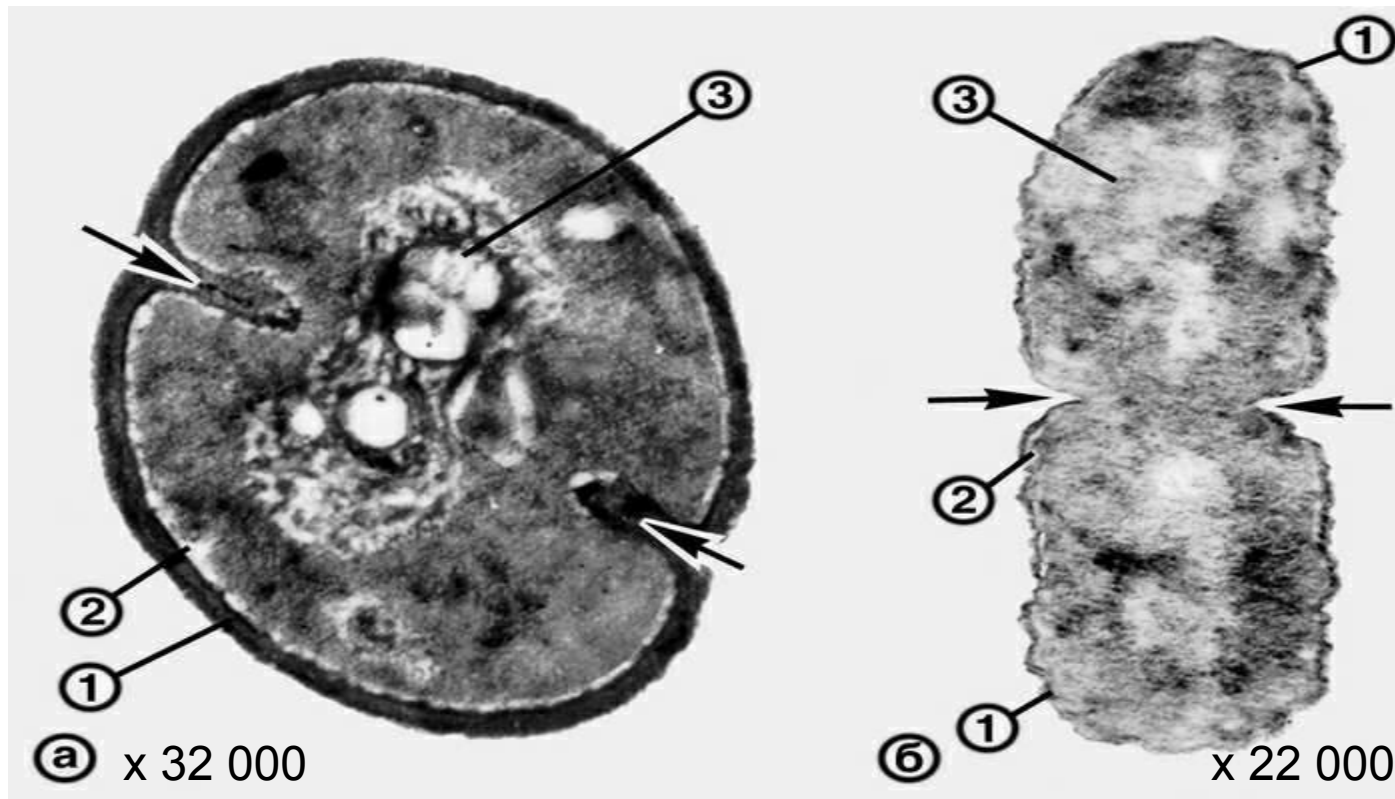


Лимфоцит. ТЭМ. ×18 000.

1 – ядро; 2 – гетерохроматин; 3 – цитоплазма;
4 – митохондрия; 5 – рибосомы.



ЭЛЕКТРОНОГРАММЫ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ ДЕЛЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ



а — стафилококк, образование перегородки деления (указана стрелками); б — кишечная палочка — формирование перетяжки деления (указана стрелками); 1 — клеточная стенка, 2 — цитоплазматическая мембрана, 3 — нуклеоид.